

**BIOLOGICAL DETECTION OF LOW RADIATION DOSES BY COMBINING RESULTS OF TWO MICROARRAY ANALYSIS METHODS**

G. MERCIER<sup>1</sup>, N. BERTHAULT<sup>1</sup>, J. MARY<sup>2</sup>, J. PEYRE<sup>3</sup>, A. ANTONIADIS<sup>3</sup>, J-P. COMET<sup>4</sup>, A. CORNUEJOLS<sup>2</sup>, C. FROIDEVAUX<sup>2</sup> AND M. DUTREIX<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS-UMR 2027, Institut Curie, Bât. 110, Centre Universitaire, F-91405 Orsay, France

<sup>2</sup> LRI, CNRS-UMR 8623, Bât. 490, Université Paris Sud, F-91405 Orsay, France

<sup>3</sup> LMC-IMAG, Université Joseph Fourier, BP 53, F-38041 Grenoble, France

<sup>4</sup> LaMI, Université d'Evry, Tour Evry 2, 523 Place des terrasses de l'Agora, 91000 Evry, France

...

To generate a homogeneous and controlled low-level radiation environment, we used a layer containing a controlled amount of radionuclide as an emitter. Diploid *S. cerevisiae* cells were allowed to grow exponentially for 12 divisions (20 hours) in the presence of various dose rates of radiation. None of the dose rates tested (< 2 Gy/h) affected cell growth. Indeed, the number of living cells and the frequency of budding cells were similar in populations growing with and without irradiation. We first estimated the range of doses that induced genetic changes such as mutations or recombination events. As already observed with acute irradiation, the frequencies of recombination and mutation events increased with the dose rate (Fig. 1). However, we did not observe any mutagenic effects at dose rates below 100 mGy/h.

We then investigated the possibility that lower doses could induce transcriptional changes that do not result in genetic modifications. For this purpose, we compared the expression profiles of 6 independent irradiated (I) cultures that were exposed to a dose rate of 15 -20 mGy/h for 20 hours with those of 12 independent cultures grown without radiation (Not Irradiated, NI).

We used DNA microarrays to characterize the gene expression patterns in the two sets of cultures (I and NI). The same control cDNA mixture, prepared from a pool of independent cultures grown without irradiation,

**DETECTION BIOLOGIQUE DE FAIBLES DOSES DE RADIATION PAR COMBINAISON DE DEUX METHODES D'ANALYSES PAR PUCE A ADN**

G. MERCIER<sup>1</sup>, N. BERTHAULT<sup>1</sup>, J. MARY<sup>2</sup>, J. PEYRE<sup>3</sup>, A. ANTONIADIS<sup>3</sup>, J-P. COMET<sup>4</sup>, A. CORNUEJOLS<sup>2</sup>, C. FROIDEVAUX<sup>2</sup> AND M. DUTREIX<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS-UMR 2027, Institut Curie, Bât. 110, Centre Universitaire, F-91405 Orsay, France

<sup>2</sup> LRI, CNRS-UMR 8623, Bât. 490, Université Paris Sud, F-91405 Orsay, France

<sup>3</sup> LMC-IMAG, Université Joseph Fourier, BP 53, F-38041 Grenoble, France

<sup>4</sup> LaMI, Université d'Evry, Tour Evry 2, 523 Place des terrasses de l'Agora, 91000 Evry, France

...

Pour générer un environnement de rayonnement homogène et contrôlé à bas niveau, nous avons utilisé une couche contenant une quantité contrôlée de radionucléides comme émetteur. Des cellules diploïdes de *S. cerevisiae* ont été autorisées à croître de façon exponentielle pendant 12 divisions (20 heures) en présence de divers débits de radiation. Aucun des débits de dose testés (< 2 Gy / h) n'ont affecté la croissance des cellules touchées. En effet, la nombre de cellules vivantes et la fréquence des cellules en herbe ont été semblables dans les populations poussant avec et sans irradiation. Nous avons d'abord estimé la gamme des doses induisant des changements génétiques tels que des mutations ou des événements de recombinaison. Comme il a déjà observé lors de l'irradiation aiguë, les fréquences des événements de recombinaison et de mutation augmentent avec le débit de dose. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet mutagène à des débits de dose en dessous de 100 mGy / h.

Nous avons ensuite étudié la possibilité que des doses plus faibles pouvaient induire des modifications de transcription qui n'entraînent pas de modifications génétiques. À cette fin, nous avons comparé les profils d'expression génique de 6 cultures indépendantes irradiées (I) qui ont été exposées à un débit de dose de 15 -20 mGy / h pendant 20 heures avec ceux de 12 cultures indépendantes cultivés sans rayonnement (non irradiées, NI). Nous avons utilisé des puces à ADN pour

was used in all experiments. The expression levels of these genes estimated by microarray analysis of populations exposed to various dose rates were used to determine the lower dose of irradiation inducing detectable transcriptional changes.

...

three processes appeared to be clearly over-represented: oxidative phosphorylation, ATP synthesis and oxidative stress. These three processes all take place on the inner membrane of mitochondria and cooperate to produce ATP and to control the reactive oxygen intermediates produced during respiration and upon exposure to radiation.

...

Transcriptional changes can be detected at dose rates as low as 0.1 mGy/h

CIIR genes were selected by comparing non-irradiated populations and populations exposed to doses of 10–20 mGy/h. These dose rates are higher than the mean level of radiation in the environment. We therefore carried out 14 assays with dose rates of between 0.01 and 10 mGy/h.

...

At dose rates as low as 0.1 mGy/h, the average induction factor was significantly higher than that of the non irradiated populations. In contrast, the repression factor appeared to be less predictable and was not clearly correlated with dose rate. However, the results obtained for this factor were similar to those obtained for the induction factor, with values clearly changing at a dose rate of 0.1 mGy/h.

...

Our results suggest that estimating induction and repression factors might be a useful way of assessing the level of exposure of a population. The distribution of the radiation induced damages in the population is stochastic and the number of cells that are not damaged should increase as the dose decreases. Thus, as the irradiated population is heterogeneous, we can assume that the decrease in the induction factor with the dose is probably due to the decrease in the proportion of “responding” cells in the population, rather than to the decrease in the level of the response in each cell.

In conclusion, we have devised a new method that can be used to detect the biological effects of pollutants in the environment. This method is based on the measurement of transcriptional

caractériser les profils d'expression génique dans les deux ensembles de cultures (I et NI)... Les niveaux d'expression de ces gènes estimés par l'analyse par puce à ADN des populations exposées à des doses différentes ont été utilisés pour déterminer la plus faible dose d'irradiation détectable capable d'induire des changements dans la transcription.

...

trois processus semble être clairement surreprésentés: la phosphorylation oxydative, la synthèse d'ATP et le stress oxydatif. Ces trois processus se déroulent sur la membrane interne des mitochondries et coopèrent afin de produire de l'ATP et de contrôler les intermédiaires des espèces réactives de l'oxygène produits lors de la respiration et lors de l'exposition aux rayonnements.

...

Des changements de la transcription peuvent être détectés à des doses aussi faibles que 0,1 mGy / h:

Les gènes CIIR ont été sélectionnés en comparant les populations non irradiées et les populations exposées à des doses de 10-20 mGy / h. Ces débits de dose sont plus élevés que niveau de radiation moyen dans l' environnement. Nous avons donc effectué 14 essais avec des doses de entre 0,01 et 10 mGy / h.

...

A des débits de dose aussi faibles que 0,1 mGy / h, le facteur d'induction moyen de gènes CIIR était significativement plus élevé que celui des populations non irradiées. En revanche, le facteur de répression semblait être moins prévisible et n'a pas été clairement corrélé avec le débit de dose. Cependant, les résultats obtenus pour ce facteur ont été similaires à ceux obtenus pour le facteur d'induction, avec des valeurs se modifiant clairement à un débit de dose de 0,1 mGy / h.

...

Nos résultats suggèrent que l'estimation des facteurs d'induction et de répression de gènes pourrait être un moyen utile pour évaluer le niveau d'exposition d'une population. La répartition des dommages radio-induits à la population est stochastique et le nombre de cellules qui ne sont pas endommagées augmente à mesure que diminue la dose. Donc, étant donné que la population irradiée est hétérogène, nous pouvons supposer que la diminution du facteur d'induction avec la dose est probablement due à la baisse dans la proportion de cellules « répondantes » dans la population, plutôt qu'à la diminution du niveau de la réponse dans chaque cellule.

En conclusion, nous avons mis au point une nouvelle méthode qui peut être utilisée pour détecter les effets biologiques de polluants dans l'environnement. Cette méthode est basée sur la mesure des changements de la

changes and the combination of the results of two analysis techniques. It is 1,000 times more sensitive than the detection of genetic mutations. It is noteworthy that this work provides no evidence as to whether continuous exposure to low-dose radiation is harmful or beneficial for life. It simply demonstrates that unicellular organisms, such as yeast, detect low levels of radiation in the environment and respond by modifying their transcriptional activity.

transcription et la combinaison des résultats des deux techniques d'analyse. Elle est 1000 fois plus sensible que la détection de mutations génétiques. Il est à noter que ce travail ne fournit aucun élément de preuve quant à savoir si l'exposition continue aux radiations à faible dose est nocif ou bénéfique pour la vie. Il montre simplement que les organismes unicellulaires, tels que la levure, détectent de faibles niveaux de rayonnement dans l'environnement et réagissent en modifiant leur activité transcriptionnelle.